(11)特群出層公園番号 特開2000-342256 (P2000-342256A)	(43)公開日 平成12年12月12日(2000.12.
(12)公開特許公報(4)	(43)公開日
(19)日本囚役背庁 (JP)	

(2000, 12, 12)

. テーパンナ・(参考) 15/00 A 2B030 1/00 A 4B024 5/00 C 4B065	審査的次 末節次 樹水項の敷11 01 (全 16 月)	(71) 田間人 000004569 日本たばご童楽株式会社			试了图录码式的LMIC用 manyonin 100088646 中国士 谷川 英次郎	素林 頁に説く
F1 C12N 16 A01H 1	春季節求	(71)田間人	(72) 発明者	(72) 発明者	(74) 代理人	
计范围设		特國平11-158025	平成11年6月4日(1999.6.4)			
(51)lbtCl. C 1 2 N 15/09 A 0 1 H 1/00		(21)出版器号	(22) HIXIE			

(54) 【兜明の名称】 植物知園への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57 [景称]

【解決手段】 植物細胞又は植物粗糙を迫心処理するこ とを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供 遺伝子導人を行うことができる、植物細胞への遺伝子導 【舞題】 従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導 入方法よりも高い効率で組織を付給することなく簡便に 人の効率を向上させる方法を提供すること。

【請求項4】 遠心処理が500G~20万Gの遠心加 [請求項5] 遠心処型が1000G~15万Gの遠心 【静水項6】 遠心処理が1秒間~4時間の範囲で行わ [請求項3] 遠心処理が100G~25万Gの遠心机 とを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる [請求項1] 植物細胞又は植物組織を遠心処理するこ [請求項2] 植物細胞又は植物粗糙を遠心処理した れる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。 速度の範囲で行われる請求項1叉は2記載の方法。 値物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。 後、遺伝子導入処理を行う請求項1配載の方法。 加速度の範囲で行われる請求項4記載の方法。 透度の範囲で行われる請求項3 記載の方法。

【静水項8】 用いる植物細胞又は植物組織が枝子植物 由来である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方 【請求項7】 遠心処理が5分間~2時間の範囲で行わ れる請求項6記載の方法。

【静水項8】 用いる植物細胞又は植物組織が単子葉植 【請求項10】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ科 物由来である翻求項8配載の方法。

【静來項11】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ又 はトウモロコシである請求項10記載の方法。 植物由来である請求項 9 記載の方法。 【発明の詳細な説明】

[発明の属する技術分野] 本発明は、植物細胞への遺伝 [000]

となく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得 は、一般的な、効率が高い、導入される遺伝子のコピー 数が少ない、T-DNという特定の倒域を断片化させるC [従来の技術] アグロバクテリウムによる形質転換法 子導入の効率を向上させる方法に関する。 [0002]

とができる作物の種類は、現状では一部に限定されてい から、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得るこ が限定されており大量の材料を取り扱うことができない 植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作出 するには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的と する形質を持った系統を遺抜する必要がある。 しかしな ならびに効率は、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物 組織に依存して大きく異なるのが実状である(Potr/kus et al. 1998(参考文献(33)))。 すなわち、形質転換に 成功していない植物種があるほか、Cく一部の品種のみ 形質転投が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織 **た特徴を持っている。このため、さまざまな植物僧で最** [0003] このように、アグロバクテリウム柱は非常 **に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否** ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れ も有用な形質転換の手段として広く用いられている。

梅爾2000-342258

3

る。したがって、このような問題点を解決することがで きる改良手法の開発が強く望まれている。

し、既处対象となる植物細胞を増加させることを目的と 究例としては、パーティクルガン(Bidney et al., 1992 文献(37))処理が上げられる。どちらも物理的に組織を **菂く、遠伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった** 植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする調著な効果も 期待される。これまでの植物組織への前処理に関する研 (参考文献(5))) および超音波(Trick et al., 1997(参考 理的状態に変換することができればたいへん利用価値が 成、培息組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの種類、供ば組織の種類などを中心に研究が行われてきた。 る前の植物粗糙を、遺伝子導入が生じやすい生理的状態 **に変換するという考え方に基づく研究は、ほとんど行わ** れていない。何らかの面便な処理により、そのような生 付属することでパクテリアの植物組織内への投入を促 れる (Rogers et al. 1988(多井文献(34)), Wisser 199 1(参考文献(38)), McCormick 1991(参考文献(29)), Lin dey et al. 1991(参考文献(28))。 従って、形質転換 【0005】これに対し、アグロバクテリウムを接倒す は、通体、必要に応じ滅菌処理を行うがそれ以外に特別 な処理を紡ずことなくアグロバクテリウムの恐<mark>染が</mark>行わ テリウムの壁渦液を接触させ、共存培費の後に形質転換 細胞の遺抜を行い、形質転換値物を作出するという場作 ではほぼ共通している。材料となる植物組織には対して [0004]アグロバクテリウムを介する形関転換方法 自体は、植物種により供試材料や培養に用いる培地の組 成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバク 系の改良は、アグロパクテリウムの箇系、ヘクター構 2 2

でなく、一般的な手法として用いられていないのが現状 く処理法ではない。なお、効果の程度や汎用性は明らか している。しかしながち、これは従来より広く行われて (17)))を発展させたものに過ぎず、新規な考え方に基づ いるリーフティスク法(Norsch et al., 1985(参考文献 C\$ 5.

導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効 は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法 よりも高い効率で組織を付傷することなく間便に遺伝子 【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的 **率を向上させる方法を提供することである。** [0000]

入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物 組結を違心処理することにより、遺伝子導入効率を有意 【蝶題を解決するための手段】本願発明者らは、魏尭研 究の結果、アグロバクテリウム阪細菌を用いた遺伝子導 に向上させることができることを見出し本発明を完成し [0001]

50 機を迫心処理することを伴う、アグロバクテリウム呪齬 [0008] すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組

笛を介して行われる植物細胞への遺伝子導人の効率を向 上させる方法を提供する。

はさせてもよい。好ましくは、値効細胞又は値効組織を 遠心処理した後、通常の重力下でアグロバクテリウム属 [発明の実施の形態] 本発明の方法では、アグロバクテ リウム関和菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子 を導入する植物細胞又は植物組織を遠心処間することを **浄う。植物細胞又は植物組織は、遠心処理した後、通常** の虫力下でアグロバクテリウム属相函と接触させてもよ いし、遠心処理しながらアグロバクテリウム脳粗菌と接 **畑笛と接触させる方法である。**

じて適宜選択されるが、通常、100G~25万G, 好 【0010】 遠心処理条件は、用いる植物の複類等に応 ましくは500G~20万G、さちに好ましくは100 造心処理の時間は、遠心加速度及び用いる植物の種 0G~15万G程度の途心加速度範囲で行われる。ま

向上させることができる。一方、遠心加速度が小さい場 類等に応じて適宜選択されるが、適保1秒間以上行うと とが好ましい。なお、遠心時間の上限は特にないが、適 頃い時間、例えば1秒以下でも遺伝子導入効率を有意に 台には、遠心処理を長く行うことにより遺伝子導入効率 を有意に向上させることができる。特に好ましい遠心処 500000011秒間~2時間程度の場合が多いが、そ の植物植物又は植物組織によっての適切な道心処理条件 お、通心処理時間は、遠心加速度が大きい場合には極く 照条件は、500G~20万G、特には1000G~1 第、10分間程度で目的を達成することができる。 な は、ルーチンな実験により容易に数定することができ [0011]本発明の方法は、アグロバクテリウム属細 道と接触させる植物細胞又は植物組織として遠心処理し たものを用いる、又は泣心処理を行いながらアグロバク テリウム属細菌と接触させることを特徴とするものであ り、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入ある いは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま **心川することができる。**

の遺伝子導入あるいは形質転換方法自体は、この分野に 【0012】 アグロバクテリウム 欧細菌を用いた植物へ **ねいて周知であり、広く用いられている。**

ium tumefaciens) が多くの双子集植物に根頭臨風偏 (c [0013] 土壌細菌アグロバクテリウム (Agrobacter hており、1970年代には、Fiプラスミドが病原性に関与 **カゲノムに組み込まれることが発見された。その後この** /とオーキシン)の合成に関与する遺伝子が存在し、相 菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかに された。T-DWの切り出しと値物への伝達にはTiブラス rown qall disease) を引き起こすことは古くから知ら すること、さらにTiブラスミドの一部であるT-DNAが摘 I-DWACは拍脑の誘発に必要なホルモン(サイトカイニ

ន

アグロバクテリウム函描描であるAgrobacterium rhizog 子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT -UNAの西格に存在するボーダー配列が必要である。他の enesもRiブラスミドによる同様なシステムを有している ミド上のグィルレンス短数 (AF放為) CF存在する通行 (図3及び図4)。

ることが期待された。しかしながち、Tiブラスミドは19 伝子を挿入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれ [0014]アグロバクテリウムの題祭によってT-DNA が植物ゲノムに組み込まれるので、T-DM上に所望の遺 045以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法で はブラスミド上のT-DNA上に遺伝子を挿入することは因 誰であった。そのため、T-CNA上に外来遺伝子を挿入す るための方法が開発された。

アーム型TiプラスミドのT-DN級域中に、三系交雑法(t ホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の菌系 al., 1983(参考文献(40)))、GV3Ti115E(Fraley et al., らを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリ 子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する2種類 の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が 容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌で複製 ができる中国ペクターを、アグロバクテリウムのディス 1983(参考文献(12))), C58C1(pGV3850) (Zambryski et 【0015】まず、腫瘍性のTiブラスミドのT-DNAから (disarmed strains) であるLBA4404(Hoekema et al., 1985(参考文献(9)))などが作製された (図3)。これ ウムのTiプラスミドのT-DW中に、あるいは所望の遺伝 (8)))を介して相同相換えにより導入する方法であり、 riparcotal mating) (Ditta et al., 1980(参考文献

杜発行(1989)))、vir域域とはこのvirA virB. vir 文联(9)); Fraley et al., 1983(参纬文赋(10)); Zathr vski et al., 1983(参考文献(40))、特開昭59-140885号 (EP116718))。もう一つは、パイナリーベクター (bin (植物パイオテクノロジー専典 (エンタブライズ株式会 り行うことができる。バイナリーベクターには、pBINL9 めに同じブラスミド上に存在する必要はないという結果 リウムと大脳窩の両方で複製可能な小さなブラスミドに 組み込んだものであり、これをディスアーム型Tiブラス (Hoekama et al., 1983)に基づいている。このvir関域 ミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。ア エレクトロボレーション法や三条女雑法などの方法によ C vin. virt及びvircの全てを含むものをいう。した (Bevan, 1984(参考文献(4)))、pBI121(Jefferson,1987 中間ベクター法と呼ばれる(Fraley et al., 1985(参考 ary voctor) 法とよばれるもので(図3)、T-DNAの値 初への組み込みにvir航域が必要であるが、機能するた Kはがれ vir vir vir vir及びviroが存在し、 がって、パイナリーベクターは、T-DMをアグロバクテ グロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、 (参考文献(19))), bCA482(An et al., 1988(参考文献

れらをもとに数多くの節たなパイナリーベクターが構築 ドのシステムにおいても、回接なペクターが構築され形 (2))、特関昭60-70080号(EP120516))などがあり、C され、形質転換に用いられている。また、Ri ブラスミ 質板技に用いられている。

の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他 の菌系より高い(tood et al.,1987(参考文献(13)); Kom ari, 1989(参考文献(21)))。この特性は、A2BJが有する TiプラスミドのpTiBo542によるものである(Ibod et a 1., 1984(参考文献(16)); Jin et al., 1987(参考文献 [0016]アグロバクテリウムA281(Watson et al., 1975(参考文献(39))は、強病原性 (super-virulent) (20)); Komari et al., 1986(参考文献(24)))。

アーム型のTiブラスミドを有する菌系EM101(Hood et a して確々の植物の形質転換に利用されている。もう一つ tor) (Hiei et al., 1994(多考文献(11)); Ishida et a は、スーパーパイナリーベクター ('super-binary' vec (図4) . このシステムは、vir樹城 (virA. virB. vir C vin virte doving (以下,Chらをそれぞれ「vir ナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の (Komariet al., 1996(参考文献(25)))。 このスーパーバ 1994(参考文献(11)); Ishida et al., 1996(参考文献(1 いシステムが昭発されている。一つはpriBo542のディス のであり、これらを上述のバイナリーベクターシステム **に適用することにより、形質転換能力の高いシステムと** l., 1996(容考文獻(18)); Kumari et al., 1999(容考文 供(26))、WO84/00977号、WO85/06722号)システムである 断片領域」ということもある。))を持つディスアーム (このうち好ましくは少なくとも vingXはvingを含む形 ステムと比べて、多くの植物種で非常に高い形質転数効 なることから、パイナリーペクターシステムの一種であ ろ。しかしながら、T-DWを有する側のブラスミド、即 も一つのと、他下館域を実質的に収除いたと、超級の他元 片、さらに好ましくはvirB及びvinを含む断片)を組み リーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーパイ 維法を介した相同組換えが容易な手法として利用できる イナリーベクターツステムは、上近の極々のベクターツ 1.,1986)およびEM105(Hood et al., 1993)を用いたも 型のTiプラスミドねよびT-DMを省するブラスミドから もパイナリーベクターにvi 低片短域のうち、少なくと 遺伝子を組み込んだT-Dvs領域を導入するには、三系交 串をもたらすことが思らかとなっている(Hiei et al., [0017] pribosaを用いて、これまでに2つの杤し 込んだ(Komari, 1990a(参考文献(22)))スーパーパイナ 8); Komari, 1990b(参考文献(23)); Li et al.,1996 (参考文献(27)); Saito et al., 1992(参考文献(3

Agrobacterium tumefaciens (例えば上述のAgrobacter [0018] 本発明の方法においては、宿主となるアグ ロバクテリウム原細菌としては、特に限定されないが、

iumtumofaciens LBA4404(Hockema et al., 1983(都书文 **特限2000-342258** 联(12)))およびElM101(hoodet al., 1986(参考文献(1 5))) を好ましく用いることができる。

€

く有意な効果を得ることができる。したがって、上述の のベクターシステムに対しても用いることができ、本発 明による効果を得ることができる。これらのベクター質 を改変した異なるベクターシステムを用いた場合におい ても回接である (例えば、アグロバクテリウム関細菌の 【0018】本発明の方法によれば、アグロバクテリウ に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることな 中国人クター、スイナコー人クター、岩径反称のスイナ リーベクター、メーバーバイナリーベクターなどいずれ 所たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導 人するなど)。また、当然ではあるが本発明の方法によ A属植描における病原性 (vir) 奴域の遺伝子群の発現 Arad数の一部または全部を切り出し付加的にブラスミ F中に組み込む、Ar値域の一部または全部を切り出し hば、野生類のアグロバクテリウム国籍的においても、 植物へ野生型のT-DW組織の導入効率を高め、中央上島

に落力いて選択することができる。大型で多数の関限部 より組み込むことができ、当数ブラスミドに回時に若し くは別途組込んだカナレイシン、パロモレイシン等の繋 **和に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選択マーカー** 位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所 田のDNA T-DNA 図版内に導入することが必ずしも容易で ないことがある。このような場合には、三系交雑法によ り、アグロバクテリウム医補因の種型内での相互組換え 【0020】値物に導入しようとする所知の遺伝子は、 上記プラスミドのT-DW超域中の超级研察的位に依依氏 を利用することで目的のDNAを導入することができる。

吹効率を向上することができる。

【0021】また、ブラスミドをAgrobacterium tumefa 従来法により行うことができ、例としては、上記した三 **承女雑法やコフクトロポフーション法、コフクトロイン** ciens等のアグロバクテリウム原価値に導入する操作は ジェクション法、氏のとの化学的な処理による方法な どが含まれる。

[0022] 植物に導入しようとする遺伝子は、従来の ため、境界配列の数は1つでもよく、複数の遺伝子を異 で、TiまたはRiブラスミド上に配置されてもよく、また は他のブラスミド上に配置されてもよい。さらには、投 賢されるものである。 しかし、 ブラスミドが放伏である 以上あってもよい。また、アグロバクテリウム国相留中 技術と同様に基本的にはT-DWの左右境界配列の間に配 なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個 数の種類のブラスミド上に配置されてもよい。

できる。例えば、10,~10,1種数/m1程度の補助 【0023】アグロバクテリウム国語図を介して遺伝子 導入を行う方法は、植物細胞又は植物組織をアグロバク テリウムロ粗菌と単に後触させることにより行うことが S

[0024] 遺伝子導入に供される細胞又は組織は、何 しく、枝子植物ならば双子葉植物でも単子葉植物でもよ 5仭定されるものではなく、葉、根、茁、安、その他い ずれの即位であってもよいし、カルスのような脱分化し た、植物の種類も何ら限定されないが、被子植物が好ま たものでも脱分化していない胚等であってもよい。ま

[0025] 下記実施例において具体的に示されるよう に、本発明の方法によれば、従来のアグロバクデリウム 生に比較して、遺伝子導入の効率が有意に向上する。 [0026]

数明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定される 【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に ものではない。

[0027]狀結函]

()cfierson RA 1987(多考文献(19))), LBA4404 (pIG121 アグロバクテリウムおよびそのペクターには、LB4404 (pTOK233)(Hiei etal., 1994 (参考文献(LL)))ねよびL th) (Hiei, Y. et al., 1994(黎郑文撰(11)), LBA4404 (p81121) (p81121は米国クローンテック社より市販. (1) アグロバクテリウムの留系およびブラスミド BA4404(pSB133) (図2)を用いた。

omari et al., 1996(争考文献(25))をSalTで消化して得 花樣,Triparchtal matind在(Ditta G et al., 1980(參 紫Sal Iで消化して得た6.2 はのDNA断片を、pSBLI(K してゾラスミドpSR27を得た。このpSB27を制限酵型Hind IIIで消化し、pIQ21(Ohta S et al., 1990(参考文献(3 [0028]なお、pSB33の構築は、以下のように行っ た。pGA482(An G et al., 1985(各考文献(3)))を制限時 製した。次いで、このブラスミドを制限酵素EcoRL、Bq1 ITで消化して8.6 IAのDNA断片を得た。このDNA断 2))をHind IIIで消化することで仰られる3.1 kbの355ブ られる5.1 kpのDNA断片と結合してブラスミドを作 中を平滑化処理し、Ball1リンカー(TaKaRa社製)を挿入 ロモーター及びイントロン介在CUS遺伝子を含む断片を 抑入してpSB33を仰た。pSB33を大脳間LE392体に導入し 考文献(8))により、pSRI(Komari et al., 1996(参考文 した。pSB13347プロバクデリウム内でpSB1とpSB33の は、ノバリン合成酵素遺伝子(nos)のプロモーターに より制御されるカナマイシン耐性適伝子(nptII)、カ 献(25)))を有するアグロバクテリウムLBA440体に導入 **町の相同組換えにより得られた。p81121のT-Dvv奴域に**

201-UNGI域には、nosプロモーターにより影響されるn t遺伝子、35SプロモーターKヒマのカタラーゼ遺伝子の イントロンが外在するQK遺伝子を有する。また、pSBJ 力が聞いスーパーパイナリーベクター(Komari, T. et a ptII遺伝子、CaMO315プロモーターに制御されヒマの カタラーゼ遺伝子のイントロンが介在するCIS追伝子を 有する(図2)。なお、pSB133及びpTCC33は形質転換能 1., 1999(参考文献(26)))である。

供域品種として、日本個品種のコシヒカリおよび月の光 を用いた。関花後8~14日目の未熟種子の類を除去し、7 06.エタノールで数秒、ツイーン20を含む1%次亜塩素酸 ナトリウム水浴液で15分間域菌処理を行った。 敏菌水で 数回洗浄役、長さ1.5~2㎜の未熱胚を摘出し供試組織と [0029] (2)供拭品種および組織 ڊ ٻ

[0030] (3) 遊心処理

イネ未熟胚を試留水入りのチューブの中に入れ、微量高 遠遠心域、大型苗道遠心機もしくは超苗遠遠心機を用い 7600~150,0000の遠心処理を行った。遠心処理終了 未禁胚にアグロバクテリウムを接種した。

[0031] (4) 接種および共存培養

1)) 。 すなわち、共存培養処理直後、組織を0.1% Trito 理後、チューブ内部の減菌水を除き、アグロバクテリウ 10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金 アミノ散及びAAピタミン類(Toriyama K. et al., 19 85(參考文献(36)). MS微量塩類 (Murashige, T et a 1., 1962(参考文献(30))、1.0 4/1 カザミノ酸、100 μ 抽としては、2N6-ASA由(Hiei et al. 1994(参札文献(1 (31)))の組成に変更して用いた。ただし、主要無機塩類 (KNG, KH PQ, CaC1, 24,0, MASQ, 74,0) については1/2 リウムを除去した後、1.0 mM 5-プロモー4-クロロ (Chilton, N-D et al., 1974(参考文献(6))) 上で3~ した後、共存培養用の培地に置床した。共存培養用の培 37.Cで1時間静置した。リン酸极衝液でアグロバクテ ムの懸濁液を加え、5~30秒間ポルテックスミキサーに 耳でかきとり、修正AA培地(AA主要無惯塩類、AA い、一部の未禁困についてX-Glucを処理することによる - 3 - インドリル- B - D - グルクロン酸 X-aluc) およ (1994) (砂地文駅(11)) によった。すなわち、因心的 ス) 化懸御することにより行った。約5分間室温で静置 ~1×10° cfu/ml に質整した。共存培養は3~13日間行 1)))の無機塩類をR2倍地(Ohira et al. 1973(参考文献 n X-100 を含む0.1 M リン酸級衝液(pl6.8) に浸漬し、 より攪拌した。バクテリア転割液の調製は、AB培地 **GIS発現を製査した (Hiei et al.1994) (参考文献(1** の速度で培地に添加した。なお、接種菌密度は1×10° Mアセトシリンゴン、0.2 Mショ数、0.2 M グルコー 木熱胚への接種および共存培養の方法は、

カザミノ酸、2 mg/l 2. 4-D)の(N4,), SQ を232 m g/lとしAM倍地(Toriyama et al., 1985(参考文献(36))) ロホレイシン#た(は10~30mg/1ハイグロレイシンを包む た。1次週抜培地には、 Hiei et al. (1994) (参考文献 共存培養後、未熱胚およびカルスを250mg/1 カルベニシ 4)(参考文献(11))による2NG倍也(N6の無偽塩および アタミン類 (Cru C. C. 1978 (参札女展(7)), 1 d/1 リンおよび250mg// セフォタキンムを含み、200mg/lバ (11) による2NGが指に30g/1のD-ソルビトールを設加 した培地を用いた(/d告地)。また、Hiei et al. (199 1次選抜培地に移植し、30.C明条件下で1~3週間培養し のアミノ酸類を添加した培地についても試験に供した [0032] (5) 形質転換細胞の遺抜

2 [0033]1次週抜培地上に形成されたカルスを、250 イシンを含む2次選抜培地上に移植し、30℃明条件下で1 ~2週間の培養を行った。2次選抜培地には、Hiei et a 1. (1994) (参考文献(11)) によるN6-枯粕 の(N4.),5 培地には、培地固化剤に8g/1アガロースを使用した。耐 文献(36)))のアミノ飲類を添加した培地を使用した。な お、パロモマイシンを合有する上記の1次および1次遺抜 ng/lセフォタキシムおよび250mg/lカルベニシリンを名 み、200mg/lパロモマイツンもしくは80mg/lハイグロマ Qを232 mg/lとしAA倍地(Toriyama et al., 1985(安考 性カルスの出現率は、2次遊抜後に調査した。

[0034] (6) 形型転換体の再分化

ロマイシンを含む再分化培他NGS培物(Hiei et al. 199 を、250mg/1カルベニシリンおよび250mg/1セフォタキシ ムを包み、100mg/lパロモマイシンまたは50mg/lハイグ 未熱胚の胚盤制位から得られた遺抜薬剤耐性のカルス 4(参考文献(11)))上に置床した。

た各類剤耐性の再分化植物の葉片を、上記のようにx-GI ucを処理することにより、GLS発現を調査した(Hiei et a1.1994(参弗文献(11)))。 再分化個体は500倍のHyp 25、C明条件下で4~5週間の再分化培費を行なって得られ oneo大統領中に移植し、25℃B条件下で約2週間有抽し [0035] (7) 再分化個体におけるQIS発現の調査 た後、協室内のボットへ移植した。

[0036](8) 結果 (i)遠心処理効果の検討

から、ほかの植物種を含めて、培養におけるカルスの酵 用いてイネの未然配への遠心処理効果を囂べた結果、10K cdvら100kcの範囲の処理で遺伝子の導入効率が高まった られなかった。なお、遠心処理は遺伝子導入効率の向上 だけでなくカルス誘導を促進する効果が認められたこと 協量高速遊心機、大型高速遊心機および超高速遊心機を (後1, 2, 3, 6)。処理時間については10分間の処理が明 **らかな効果が認められた(桜4, 5)。また、コンヒカリと** 月の光の品種間でのGISの一道性発現頻度に違いは認め

特別2000-342256

9

[0037] 数8の結束から超高活通心強を用いた250K 考度すると微量高速速心機および大型高速速心機を使用 3)のみなのか、資体のスイナリースクターであるLBM404 く認められなかった。しかし、110kgの60分が阻ぐはカル ス誘導が確認され、GIS発現も高串で認められた。 同様に コシヒカリについても担高法値の数を用いた250 KG-60 分処理では、未免胚からのカルス誘導が認められなかっ た。以上の枯果から、イネ末然既における遠心処理の効 **に表9,10,11の結果から、形質転換能力が高いとされ** るスーパーパイナリーベクターを有するLBM40A(pSB13 の60分処理では、月の光米熱胚からのカルス緊導が全 **県の範囲は346~2004Gと考えられ、処型方法の値便性を** する場合には、2002、40020四が適当と考えられる。さら (pIGI211m)でも、20KG・60分の遠心処理により未熟胚を 用いた形質気技が可能であることが明らかとなった。 44よび増殖に有用であることが示唆された。

治数数間が9日についても別の実験で描い。CDS先現が認め られた。現在、共存培養期間が異なる各種未熟胚を一次遺 ン)で培扱しているが、9,13日共存の区では、3,6日の共存 表-7,800枯果から共存培養期間が3日より6,13日がト ランジェントアゥセイで描いGAS発現効率を示した。共存 校站街上(10pps/ イグロレイツン, 200pps/ロモレイツ 区と比較して栗和耐性カルスの出現率が低い傾向にあ 【0038】(ii) 強心処理と共存培療処理の検討

(0039](iii) 遠心処理による形質転換効率の製

をそれぞれ頃化し、復培を継続している。一部分の系統に 現在、上記により作出したの時間他の形質転換体(没4,5) ついては、採組を終了し給性間弦を行った。その結果、迫 心処理した形質転換体は無処理の形質転換体(コシヒカ リ、月の光)と比較し、形態ねよび松性に並は認められな

は、イネのカルスを材料として比較的高い効率で形質転 **換が行うことができることを報告している。また、Aide** 【0040】 Hiei et al. (1994 (存集文献(111)))

mita RR et al. 1996(各地文献(1))は、イネの米松阳を 用いた形質配換例を報告している。これらの形質配換手

法をより効率よく安定して契枯するために、上述した迫 心処理法は非常に有効である。特に、未熱胚は殺培環境 に左右されやすく形質転換に好適な未熟胚材料を常時得 ることは容易ではないが、強心処理を指すことにより安 力の隔いんクターのあるスースースナリースクターが Aldemita et al., 1996(参考文献(1))によれば、スーバ --バイナリーベクターのLBAAOA(pTOIQ33)を用いた状態 定した高い形質配換効率を推持することが可能である。 Hiei et al. (1994 (参考文獻(11)))は、形質航政協 イネの形質転換効率を向上させることを示した。また、

においてのみ、形質核液体を得ている。本研究における 遠心処理法は、通ばのパイナリーベクターを用いた場合

ಜ

.Cで24時間処理した後、青色の量色を示す組織を取像

ន

hるnptII遺伝子、355プロモーターにより制御されるhp

ーにより制御されるcus遺伝子を有する。pICL211fm及びp

リフラワーモザイクウィルス (CAM) の35Sプロモータ

IDG33のI-DV組版には、nosプロモーケーにより創留さ

び20% メタノールを合むリン酸酸衝浪を設加した。37

8

特開2000-342258

:で全く形質転換体を得ることができなかった品種におい ても形質転換体を得ることができるものと推察される。 か、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができる。ま **においても、スーパーパイナリーベクターに匹敵する**

ることにより、より一層効率を向上させることが可能で た、スーパーパイナリーベクケーと遠心処理法を併用す

(表1) 表1 各種遠心処理と共存倍登後のGS発現結 [0041]

果 (供试菌系: LBA4404/pSB133) ある。さらに、遠心処理法を用いることにより、これま*

	数数四数数		盛心加速度		
4.4.ti	(cfu/ml)	# XC III	9 09/.	8, 600 @	19, 100 0
	1×10°	3/10(+)	6/10(+)	1/10(++)	7/10(+++)
37529	1×10°	\$/10(+)	0/10(-)	4/10(++)	1/10(+++)
;	1×104	(+)01/ *	3/10(+)	8/10(+++)	1/10(+++)
AOX	1×10	(+)01/1	€/10(+)	2/10(+)	7/10(+++)

% [0042] 函心処理時間:10分,共存培養期間:3~5日,GUS開性

未熟胚数/供其未熟胚数

[報2] 報2 コントカリ米製用からのバロホレイツン

()内は胚盤におけるOS発現倒域の面積 --なし,+:

*

団性カルスの出現率 (供試菌系:LBM404/pSB133)

小, 4:中, 44:大

(6:1-//4) #8589 780 g	#处码 780 0 4. 6h (1/21) 0. 0h (0/22)	8, 500 G	19, 100 g 31, 8% (7/722)
	4. 8h (1/21) 0. 0h (0/22)		31. 81 (7/722)
1 × 10° 4, 5h (1/22) 4, 6h (1/22) 1 × 10° 0, 0h (0/22)			
1 × 10° a 0 (0/21) 0.0 (0/22)		16. 74 (3/16)	13. 59 (2/15)
		14. 35 (3/21)	18.2%(4/22)
K #11 1×10 0.08 (0/23) 0.08 (0/21) 0.09		0, 05 (0/18)	0.0%(0/22)

★[0043] 母性カルスの出現した未熟胚数/供試未熟胚数、2次遺

[数3] 数3月の光末熱胚からのパロモマイシン耐性力 ルスの出現率(供試菌系: LBM404/pSB133) * 遠心処理時間:10分,共存培登期間:3~5日

38, 48 (4/11) 54. 5% (6/11) 45.6%(5/11) 9. 15(1/11) 19, 100 G 36.98(5/10) 27. 3%(3/11) Q CM (Q/10) | 0. CM (Q/15) | 8. 1% (1/11) 0.08(0/11) 8, 600 0 Q. ON (Q/11) 0. ON (Q/11) a 04 (0/11) 0.04 (0/11) 0. 04(0/11) 9. 14(1/11) をおける。 780 0 無処理 今福祉 存租回免股 (cfu/al) . 10° 1 1 10 1 . 10 2 125% F. 25.55

☆[0044] 団性カルスの出現した未熱胚数/供試未熱胚数、2次類

【教4】表述心処理時間と共存培養後のGS発現結果 (品種:コンヒカリ) ⋨ 这心処理時間:10分,共存培養期間:3~5日

10/10(+++) ₩8 10/10(++) 10/10(++) **₹**8 因指数以少规 8/10(++) 10/10(+) 10分 (i)01/6 D/10(+) 食の見 LEAM 404 (p TOK233) LBM404 (650133) 個条及び 7522 F

遠心加速度:20,000G、供試品種:コンヒカリ GUSB性

胚盤質型におけるの8発現質域の面積 +:小、++:中,++ 未熟胚数/供試未熟胚数

【表5】 表-5 遠心処理時間とバロモマイシン耐性カル スの出現率(品種:コシヒカリ)

[0045]

特開2000-342256 8

Ħ

中協存				连心机理阵用		
野	6. 黄条件	#	無処理	10%	₩o's	809
	E	雁	0.0%(0/31)	34. 35 (19/36)	35. 05 (14/40)	E3. 3% (16/30)
	ĝ					
± \$7	*	籽	所 0.0%(0/32)	64.18(20/37)	34. 25 (13/38)	58. 61(17/20)
	(3dC)					
	6	Æ	FF 0.05(0/31)	20.05 (3/36)	(60/91) 49 '90	40 CM (12/30)
	(3oC)					
表 表	*	腔	FF 0.0%(0/32)	(90/11)19 (87	41.05(15/38)	S3. 35 (10/30)
	S					

* [0046] 遠心加速度:20,000G、共存培發期間:3~5日、2次遺抜

[表8]表6 遠心処理強度と共存培費後のars発用。品 4: 月の光)

団性カルスの出現した未熱胚数/供試未熱胚数

		未免压力			
お食品で、共存協権	共存指徵	HOLK!	胚壁における als 発現和度	UMIX	
	100		Ħ	+	*
1	3 8 70	0	-	0	0
では、	9 E E	0	2	9	2
- [50 E	•		~	•
SAL	8812	0	0	•	9
1	3 B E	_		_	
	98	٥	0	0	2
4	3 8 53	_	•	•	_
300	8 8 8	0	0	2	60
	E .	2	•	0	
avnez	9 8	2	•	•	

供試商系:LBA4404/pIC1211m, 過心処理時間:60分

+:1/8-1/4, ++:>1/4 [0047]

1) 微量高速速心機 2)大型高速速心機 3)超高速速心

胚盤部に占めるの8発現領域の割合 -:なし,±:<1/8,

【数7】数7 · 鱼心処理および共存给鉴别間と共存给鉴 後のdus表現(品種:月の光)

特開2000-342256 ව

19

肝登における els 発現頻度 未算压力 **各種語で、共存協権** 13日 13 B E E C 3 8 8 8 0 38 200 6 11 150 8 8 8 4003 2 **医松果** = 98

* +:1/8-1/4, +:>1/4 供試図系:LBA440A/pICI211h, 1)後推商選送心協 2)

大型商品融心器

[0048]

それぞれの回転数に対し、60分間の遠心処理

【数8】数8 遠心処理ねよび共存培養期間と共存培養 胚盤部に占めるQLS免項類域の割合 -:なし,±:<1/8, *20 後のQLS発現(品種:コシヒカリ)

1		*PART			
中で		医費におり	胚費における 🛍 発現知度	加度	
Z.M.	25		41	+	1
	3 8 8	•	•	•	0
無知識	8 8				
	13日間	_	•	2	_
	3 8	۰	•	-	
2000	20 11 0		•	~	•
	13 8周	0	0	1	•
	3 11 12	_	•	Ţ	
4 DMD+	6.000		•	0	9
	13 8 (2)	•	•	_	

*+:1/8-1/4, ++:>1/4 ≈ 供試图系:LBA4404/pIGI211m, 1)微量高速迫心绩

大型市湖田心森

【表9】表9 LBM404(pBI121)による形質転換結果(品 [0049]

種:月の光) % \$ 胚盤部に占めるQS免現域域の割合 -:なし,±:<1/8, それぞれの回転数に対し、50分間の迫心処理

各相包理	供文术外压数	MACK	GUS 掛性數	形質転換効率
無処理	8	11	12	24.0(%)
強くも死	150	8	3	36.0(%)

遠心処理:20kG·60分 共存培養5日間

[0000]

【表 1 0 】 表 10 LBA4404(pIC1211fn)による形質転換格

果(品種:月の光)

特開2000-342256 දි

7

各種処理	供其木勒形数	類化数	凝补槽 SID	形質影散物母
A 50.12	\$		3	7.6(%)
明めるな		9		2

遠心処理:20KG·60分 共存培養5日間 [0051]

* (表11) 表11 1844404(p81121)による形質転換格県

(品種:コシヒカリ)

各拉西	供如果和我	数は数	海網町	形型研究
展	8	4	2	4 160
遊び煙	274	8	ız	0988

遠心処理:20KG·60分 共存培養5日間

[0052]

※ [表12] 表12 LBA4404(pSB133)による形質転換結束 (品種:コシヒカリ) ×

邻勒理	供此為無政	原後	as開級	形質研修如中
制理	83	0	-	0 0 0
游达四	Æi	8	ន	8 260

设心处理:20KG·60分 共存培養3日間

大きさ約1.2 mmのトウモロコシ末熱胚 (品種A188, 鳳林 水産省生物資源研究所より入手)を無菌的に取り出し、 [0053] 実施例2

x 10 cfu/mlの遠度で、Agrobacterium tumefaciens LB IS-inf液体指出で一回発浄した。遠心能に未熟限と100 uMのアセトシリンゴンを含むLS-inf结构2.0 mlに約1 M4404(pSB131) (Ishida et al. 1996(参考文献(18)))

を懸濁した液を加え、40,000c, 4°Cで30分間迫心処理し 間、室温で静置した。処理後、複やかに攪拌した後、胚 た。対照の未熟配は、前記と同様の相函點関液中で30分 た、過心処理後の未熟胚への接種は、以下の通り行っ 植面が培地に接するようにLS-AS培地に留床した。ま

た。無菌的に取り出した未熟胚をLS-inf液体培地で一回 経濁した液を加え、核やかに脱砕した。5分間室温で粉 先争した後、回波体培地を含む違心質に移し、20 KGま 体培地中で1時間、室温で静置した。処理後、液体培地 を除き、約1 × 10° cfu/mlの遺度でLBA4404(pSB131)を **澄した後、胚軸面が倍地に接するように10 μM AdVO** たは40 KGで4で、1時間の遠心処理を行った。対照は液

した。なお、上記の焙焙および焙染法は、Ishida, Y.et [0054] LBA4404(p58131)を接種したA188末熱胚で のQIS遺伝子のトランジェントな発現を表13K示す。 al. 1996(参考文献(18))に記載の方法に従った。

よる遺伝子導入部位の増大は、アグロバクテリウム菌と ともに遠心処理を行った場合、遠心処理後アグロバクテ リウム協を接触した場合の両方で認められた。また、遠 米熱胚に比べ、遠心処理を行った米熱胚では、より広い 範囲での発現を示すものが多く確認された。逸心処型に 心強度及び処理時間を変えた場合でも対照に比べより広 いずれの未熟胚もCAS遺伝子の発現を示したが、対照の い範囲でのds遺伝子の発現が認められた。

【0055】以上の結果から、遠心処理した米熱胚を遺 抜店地でも着すれば、対照の比へより高い効率で、形質 **応換植物の得られる可能性が示された。また、従来のア** グロバクテリウム法では形質転換できなかったA188以外 8)) についても遠心処理することにより形質転換値物 のトウモロコシ品種 (Ishidaet al. 1996(参考文集(A

の得られる可能性が示唆された。

A188末税阻でのGK遺伝子のトラ [表13]表13 ンジェントな発現

を含むLS-AS培地に置床した。25℃、暗黒下で3日間共存

冶費した後、一部の米熱胚を採取し、実施例1と同様に

x-gluckよりans遺伝子のトランジェントな発現を調査

対照は1 GCの処型。試験1はアグロバクテリウム菌共存 Fで遠心処理を行った。試験2は遠心処理後、アグロバ

カテリウム菌の接種を行った。

ム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供 された。本発明の方法は、単子禁値物に対しても双子薬 [発明の効果] 本発明により、従来のアグロバクテリウ 偽することなく節便に遺伝子導人を行うことができる、 植物に対しても適用可能である。

[0058] 参考文献

& Nester, EM., (1985)New cloning vehicles for tran 988) Binary vectors. In Gelvin, S.B. and Schilpero ort, R.A. (eds.), Plant Molecular Biology Manual A (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1 (4) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors (1) Aldemita RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium tu mefacrons-modiated transformation of japonica and (3) An, G., Watson, BO., Stachel, S., Cordon, MP. for plant transformation. Nucleic Acids Res., 12, sformation of higher plants. EMBO 1., 4:277-288. 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19. indica rice varieties. Planta 199: 612-617

ile bombardment of plant tissues increases transfo mation frequency by Agrobacterium tumefaciens. Pl M., Sims, L., and Huffmarm G. (1992) Microproject (5) Bidney, D., Scelonge, C., Nartich, J., Burrus, ant Mol. Biol., 18, 301-313.

(6) Chilton, M-D., Currier, TC. Farrand, SK. Bendi um tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not d etected in crown gall tumers . Proc. Natl. Acad. S ch, AJ. Gordon, MP. RNester EW. (1974) Agrobacteri

Chu, C. C., (1978) Proc. Symp. Plant Tissue Cu lture, Science Press Peking, pp.43-50 d. USA, 71:3672-3676 S

bank of Rhizobium meliloti. Proc. Natl. Acad. Sci. (8) Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helin ski, D.R. (1980) Broadhost range DNA cloning syste m for Gram-negative bacteria: Constructionof gene

(9) Fraley, R.T., Roques, S.G., Horsch, R.B., Eich

oltz, D.A. and Flick, J.S. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transfor mation. Bio/technology, 3, 629-635.

(10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., San (1983) Expression of bacterial genes in plant cel G.R., Coldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. ders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M. L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi,

20

T. (1994) Efficient transformation of rice (OrVza sativa L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. The Plan (11) Hiei, Y., Chta, S., Komari, T. and Kumashiro, ls. Proc Natl Acad Sci USA, 80, 4803-4807. t Journal, 6, 271-282.

(12) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. a 30 of the Aqrobacterium tumefaciers Ti-plasmid. Natur strategy based on separation of vir- and T-region nd Schilpercort, R.A.(1983) A binary plant vector e, 303, 179-180.

Hoekema, A. (1993) NewAgrobacterium helper plasmid (1987) Virulence of Agrobacterium tunefaciens stra (14) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and s for gene transfer to plants. Transgenic Res., 2, (13) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. in A281 on legames. Plant Physiol, 83, 529-534.

(15) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Ch erium tumefactons A281 is encoded in a region of p ilton, M.-D. (1986) The hypervirulence of Agrobact Ti80542 outside of T-DNA. J. Bacteriol., 168, 1291 208-218. \$

endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti-plasm (17) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., E (16) Hood, E.E., Jen, G., Kayes, L., Kramer, J., F id vector for genetic engineering of plants. Bio/t raley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction

ichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985)

8

3

A simple and general method for transferring gene

(18) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Ko mari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency Agrobacterium tumefaciens. Nature Biotechnol, 14, transformation of maize (Zea mays L.) mediated by s into plants. Science 227, 1229-1231.

(19) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric gene s in plants: the QUS gene fusion system. Plant Mo

E.W. (1987) Genes responsible for the supervirule (20) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, nce phenotype of Agrobacterium tumefaciens A281. 1. Biol. Rep., 5, 387-405.

hysiol. 31: 805-813.

(21) Komari, T. (1989) Transformation of callus cu ltures of nine plant species mediated by Agrobacte Bacteriol., 169, 4417-4425.

(22) Komari, T. (1990a) Genetic characterization o f double-flowered tobacco plant obtained in a tran sformation experiment. Theor. Appl. Genet.,80, 167 rium. Plant Sci., 60, 223-229.

2

(23) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of Chemopodiumquinoa by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulenceregion of pTiBo542. Plant Cell Reports, 9, 303-306.

(24) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (19 grobacterium tumefaciens tumor-inducing plasmid pT 86) Physical and functional map of supervirulent A 180542. J. Bacteriol., 166, 88-94.

(25) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. an 30 d Kumashiro, T. (1996)Vectors carrying two separat e T-DWAs for co-transformation of higher plants me diated by Agrobacterium tumefaciens and segregatio n of transformants free from selection markers. Pl

etic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In (26) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Gen Vasil, I.K. (ed.) Molecular improvement ofcereal crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. ant J, 10, 165-174.

(27) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Puon ti-Kaerlas, J. (1996)Genetic transformation of cas sava (Nanihot esculenta Crantz). Nature Biotechno 1., 14, 736-740.

(29) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato Regeneration and transformation of sugarbeet by Ag robacterium tumefaciens. Plant Tissue Culture Manu (28) Lindsev, K., Gallois, P. and Eadv, C. (1991) al 87:1-13. Kluwer Academic Publishers.

特開2000-342256

(30) Murashiqe, T. and Skooq, F. (1962) Physiol. P dies on the mutritionof rice cell culture I. A sim (31) Chira, K., Ojima, K., Fujiwara, A. (1973) Stu ure Manual 86:1-9. Klumer Acadomic Publishers. lant 15:473-497.

ple, defined medium for rapid arrowth in suspension

an intron within the coding sequence. Plant Cell P K. (1990) Constructionand expression in tabacco of aß-glucuronidise (QJS) reporter gene containing (32) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Namamura, culture. Plant Cell Physol., 14:1113-1121. 2

(33) Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Saut ter, C. and Schrott, M. (1998) Agricultural Biotec nology, NY:Mercel Dekker Inc. pp. 119-159.

sformed plants using Ti plasmid vectors. Wethod fo (1988) Gene transfer in plants: Production of tran r Plant Molecular Biology, CA: Academic Press Inc. (34) Rogers, S.C., Horsch, R.B. and Fralley, R. T. pp.423-436.

mosaic virus-tolerant transquaic tomato plants ex Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) Cucumber pressing a satellite RWA. Theor. Appl. Genet., 83, (35) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi,

(36) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) Plant Sci. 679-683.

(37) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1597) SAAT: soni cation-assisted Agrobacterium-mediated transformat ion. Transgenic Research 6:329-336. 41:179-183

(38) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transf ormation of potato bu/Aqrobacterium tumefaciens. Pl ant Tissue Culture Manual 85:1-9. Kluwer Academic

ton, M.-D. and Nester,E.W. (1975) Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. J Bac (39) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chil teriol, 123, 255-264. Publishers.

rs,).. Van Montaqu, M. and Schell, J. (1983) Ti p lasmid vector for the introduction of DNA into pla nt cells without alteration of their normal recene (40) Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leema ration capacity.EMBO J, 2, 2143-2150.

[図面の簡単な説明]

[図1] 本発明の方法に好ましく用いることができるス ーパーパイナリーベクターの例であるpidG33の構築方 法を示す図である。

[図2] 本発明の方法に好ましく用いることができるス ーパーパイナリーベクターの例であるpSB13の遺伝子地

図を示す図である。 with Agrobacterium tumefaciens. Plant Tissue Cult 50

特開2000-342258

3

IF ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 *IC イントロンGUS通位子 【図3】アグロバクテリウム阿細菌の主要な2種類のペ クターシステムである中間ペクターシステムとバイナリ

H 制限研案HindIII 部位 K 制函解業Kpul時位

> [図4] アグロバクテリウム ツメファシエンスの強病 原住苗林281に由来する2種類のパイナリーベクターシ

ステムを示す模式図である。 【作号の説明】

ーベクターシステムの構築過程を示す核式図である。

Apr アンアション配和過行子

Thos ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター Phos ノバリン合成群紫遺伝子のブロモーター BAR bar遺伝子

P355 Cally 355プロモーター

10 CDS, cos ラムダファージのCOS部位

ORI, ori ColELの複製開始点

virC Agrobacterium tumefaciens A281に含まれるTi

virß Agrobacterium tumefaciens A281だ含まれるTi グシスミ Fpriso22のグィルレンス強威中のVira通行子 ゲジスミ Fibri 80名2のグェラレンス図域中のArcia Rif

グラスミドpriso22のヴィルワンス密数中のArcaの子 BL アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの左ボーダ vinG Agrobacterium tumefaciens A281に含まれるTi

NPT,NPTII カナマイシン抵抗性遺伝子

Vir アグロバクテリウム原袖菌のTiブラスミドの全Vir

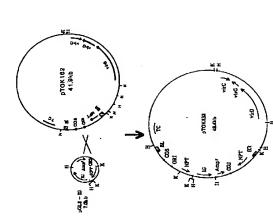
S vir 強病原性アグロハクテリウム腐細菌のTiブラス

s vir TiブラスミドpTi8o542のvir鐵板の一部を合む % FpTiBo542の金vin的

RR アグロバクテリウム原抽筋のT-DNAの右ボーダ

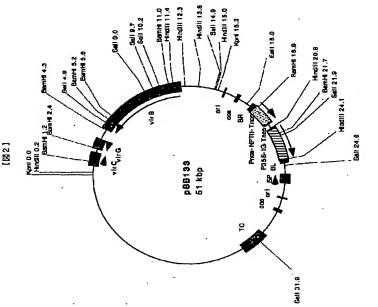
SP スペクチノシムツン抵抗性過位子 IC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

[図]



特開2000-342258

3



[🖾4]

スーパーバイナリーベクター

強病原性菌系によるバイナリ

-ペクターシステム

システム

48024 AA20 BA12 CA04 DA01 EA10 ドターム(参考) 28030 AA02 A803 AIZO CAO6 CAL7 CAL9 CB02 CD03 CD07 CD09 FA10 CA17 GA25 HA20 71(0) £1(0)

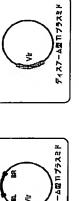
(72)発明者 石田 祐二 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

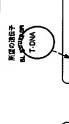
特開2000-342256

3

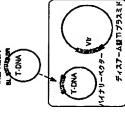
ディスアーム型商系 (タイプ2) (83) 野生型菌株 **医成形成设伍子的去**

ディスアーム型菌系 (タイプ1) ディスアーム型 ロブラスミド





所置の首伝子



ディスアーム型 ロブラスミド



中間ベクター保有酸系

ディスプーム型 コプラスミド

T-0.¥

中間ベクターシステム

バイナリーベクターシステム

ンロントページの説を

48065 AA11X AA89X ABO1 ABO3 AC10 BA25 BC50 CA31 CA60